



ARTIGO

Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae)

Jackeline Jorge¹, Monique Cristine Rodrigues Juras¹ e Rogério Mamoru Suzuki^{1*}

Recebido: 3 de julho de 2014 Recebido após revisão: 5 de novembro de 2015 Aceito: 10 de julho de 2015
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3083>

RESUMO: (Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae)). *Cattleya warneri* é uma orquídea de características ornamentais ameaçada de extinção. Por este motivo, estudos sobre a propagação e desenvolvimento dessas plantas são extremamente importantes. Assim, este trabalho procurou avaliar a influência do meio de cultura na germinação *in vitro* de sementes de *C. warneri*, no desenvolvimento inicial dos protocormos até a formação das plântulas, bem como no crescimento dessas durante o primeiro ano de cultivo *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que os meios favoráveis à germinação para esta espécie foram MS e MS½; para o desenvolvimento inicial dos protocormos foi o meio KC; e para o crescimento das plantas no estágio posterior, os meios MS e MS½ foram os mais propícios. O meio favorável à germinação não foi benéfico para as fases posteriores. Cada etapa do desenvolvimento *in vitro* desta espécie exige um meio de cultura, confirmando a existência de uma necessidade nutricional específica para cada etapa do desenvolvimento das orquídeas, uma vez que a germinação e o desenvolvimento das plantas varia de uma espécie para outra.

Palavras-chave: germinação assimbiótica, cultivo *in vitro*, meios de cultura, orquídea.

ABSTRACT: (*In vitro* germination and initial growth of *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae)). *Cattleya warneri* is an endangered ornamental orchid. Thus, studies on its development and propagation are of major importance. We aimed to evaluate the influence of the growth medium on the *in vitro* germination of seeds of *C. warneri*, on the initial development of its protocorms until seedling formation, and on seedling growth during the first year of *in vitro* culture. Our results showed that the culture media favorable to germination were MS and ½ MS; to the initial protocorm development was the KC medium; and to the growth of plants at the subsequent stage were also MS and ½ MS. The favorable medium to germination was not beneficial to ulterior stages. Each stage of the *in vitro* development of this species requires a specific culture medium, which confirms the existence of specific nutritional requirements for each developmental stage of orchids. Seed germination and plant growth may vary among orchid species.

Keywords: asymbiotic germination, *in vitro* culture, culture media, orchid.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada a mais atraente entre o grupo das angiospermas devido à beleza de suas flores de diferentes cores e formas. Apresenta distribuição cosmopolita, compreende cerca de 800 gêneros e o número de espécies é de mais de 35.000, possuindo diferentes hábitos: terrícolas, epífitas, rupícolas e mais raramente micoheterotróficas (Dunsterville & Garay 1976, Dressler 1993). No Brasil, segundo Barros *et al.* (2014), há 2442 espécies de orquídeas, sendo que, 1632 são espécies endêmicas.

Cattleya warneri possui algumas características próximas à *Cattleya labiata*, como descrito por T. Moore, em 1862. *C. warneri*, objeto deste estudo, floresce entre os meses de junho e julho (Braem 1986), é endêmica dos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. As principais características desta espécie são representadas por plantas com uma folha sob pseudobulbos subclavados. A maioria das folhas é oblonga, porém algumas são quase arredondadas. As flores são grandes de 15-20 cm de diâmetro, aromáticas, vistosas e com coloração que varia do rosa escuro a púrpura ametista (Fig. 1) (Whitner 1988).

Por ser uma espécie ornamental e possuir elevado valor de mercado, há muito tempo vem sofrendo grande extrativismo do seu habitat natural para exploração comercial. Além disso, a destruição do habitat levou essa espécie a ser considerada como de alto risco de desaparecimento da natureza em futuro próximo (MMA 2008).

Knudson em 1922 descreveu seus trabalhos sobre a germinação de sementes de orquídeas *in vitro* em meio de cultura asséptico e na ausência de fungos. Desde então, a germinação destas vem sendo realizada por meio do cultivo *in vitro*, técnica esta que possibilita o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas, estimulando o crescimento, e assim adquirindo o controle sobre o cultivo dessas espécies (Stewart & Kane, 2006, Suzuki *et al* 2012). Estudos que tenham como finalidade estabelecer os processos de propagação das orquídeas são extremamente importantes para que seja possível viabilizar a sua multiplicação em coleções vivas e possibilitar tanto a reintrodução na natureza como também a conservação daquelas espécies ameaçadas de extinção (Ferreira & Suzuki 2008). Os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* são os meios de Knudson (1946), Vacin & Went (1949) e Murashige

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa, Orquidário do Estado. Avenida Miguel Stéfano 3687, CEP 04301-902, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: rogeriomsuzuki@yahoo.com.br



Figura 1. Aspecto geral da flor de *Cattleya warneri* T. Moore. Barra: 5 cm.

& Skoog (1962). Em relação à composição nutricional que favorece a germinação e o crescimento *in vitro* de orquídeas, o conhecimento ainda é bastante escasso.

O presente trabalho avaliou a influência de diferentes meios de cultura na germinação de sementes e no crescimento inicial das plantas de *C. warneri*, bem como o crescimento subsequente após 180 dias de cultivo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* do Núcleo de Pesquisas - Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica (IBT), em São Paulo, SP. Como material de estudo, foram utilizadas plantas de *C. warneri* selecionadas previamente para polinização cruzada, pertencentes à coleção científica “Frederico Carlos Hoehne” do referido núcleo do Instituto de Botânica de São Paulo.

O procedimento utilizado para a obtenção da percentagem de sementes viáveis foi uma adaptação de Suzuki *et al.* (2012) do proposto por Lakon (1949).

Para a avaliação da viabilidade das sementes, pequenas porções de sementes de três frutos maduros foram previa-

mente embebidas durante 4h em água destilada, a água foi retirada e as sementes imersas em solução aquosa (1%) de sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio) e armazenadas a 30°C na ausência de luz, durante 30h. Após esse período três amostras, totalizando aproximadamente 1300 sementes, foram retiradas aleatoriamente e analisadas em estereomicroscópio, sendo consideradas viáveis as sementes com embrião corado de vermelho intenso (teste de tetrazólio).

Para a semeadura, em uma câmara de fluxo laminar, as sementes foram embebidas em água deionizada e esterilizada durante 30 min. e posteriormente desinfestadas com 50 mL de uma solução de 15% de hipoclorito de sódio comercial (2% a 2,5% de cloro ativo) durante 10 min. sob agitação constante. Em seguida, a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes em água deionizada e esterilizada, sendo subsequentemente inoculadas em quatro meios de cultura: Knudson C (1946) (KC), Murashige & Skoog (1962) (MS), MS com metade da concentração de macro e micronutrientes (MS½) e o meio Vacin e Went (1949) (VW), todos suplementados com 2% de sacarose e modificados com micronutrientes do meio MS (Tab. 1). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, constando de quatro repetições (frascos) de cada meio e três lotes de sementes, sendo inoculadas cerca de 3.000 sementes em cada frasco. Estes foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 12h e intensidade de luz de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. O pH dos meios foi ajustado para 5,8±0,05 anterior à adição de 0,4% de ágar para a geificação dos meios de cultura. Após a homogeneização, foram distribuídos em frascos de vidro de 200 mL, sendo que em cada frasco foram colocados 40 mL de meio de cultura e, em seguida, foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,3 atm durante 20 min. Decorridos 20 dias da inoculação das sementes, foi obtida a percentagem de germinação das sementes a partir da retirada aleatória de duas amostras de cada um dos frascos dos diferentes meios de cultura (KC modificado, MS, MS½, VW modificado) realizada por meio de adição de 3 mL de água

Tabela 1. Composição dos nutrientes dos meios de cultura utilizados para a germinação assimbiótica de sementes, desenvolvimento inicial e crescimento de plântulas de *Cattleya warneri* e comparação com o meio P723.

Nutrientes (mM)	KC ^a	MS ^b	VW ^c	P723 ^d
Amônia (NH ₄ ⁺)	7,57	20,62	7,57	5,15
Nitrato (NO ₃ ⁻)	8,47	39,43	5,20	9,85
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	1,84	1,25	3,13	0,31
Potássio (K)	1,84	20,06	6,97	5,62
Sulfato (SO ₄ ³⁻)	4,84	1,50	4,90	0,71
Cálcio (Ca ²⁺)	4,24	3,01	1,93	0,75
Magnésio (Mg ²⁺)	1,02	1,50	1,02	0,62
Cloro (Cl ⁻)	-	6,03	-	1,50
Nitrogênio total	16,04	60,06	12,77	15,00
Relação NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻	0,89	0,52	1,46	0,52

a. KC, Meio Knudson C.

b. MS, Meio Murashige & Skoog.

c. VW, Meio Vacin and Went.

d. A composição do meio P723 está apresentada apenas para comparação (Ver Resultados e Discussão).

esterilizada, posterior homogeneização e coleta de duas amostras de 1 mL contendo as sementes para análise.

Cada amostra foi depositada sobre uma lâmina tracejada em quadrantes de $0,5 \times 0,5$ cm para facilitar o processo de contagem. Foram analisadas cerca de 1300 sementes para cada meio, e consideradas germinadas as sementes com embrião intumescido, clorofilado e sem testa.

A análise do desenvolvimento pós-seminal foi realizada aos 90, 120 e aos 180 dias após a semeadura, para identificar as diferentes fases de desenvolvimento presentes em cada meio de cultura. Para tanto, pequenas porções de sementes em desenvolvimento foram retiradas aleatoriamente de cada frasco e analisadas em estereomicroscópio, totalizando cerca de 300 protocormos analisados para cada meio. A identificação foi efetuada conforme Suzuki et al. (2010), considerando-se quatro estádios de desenvolvimento: estágio 1, Protocormo de coloração verde, sem testa encobrindo-o; estágio 2, protocormo com formação da primeira folha; estágio 3, protocormo com duas ou mais folhas; e estágio 4, planta com folhas e uma ou mais raízes.

Para o estudo sobre o crescimento inicial, foram utilizadas plântulas com 180 dias de cultivo após a inoculação das sementes. Essas plântulas se encontravam no mesmo ambiente acima descrito e possuíam comprimento ($1 \pm 0,2$ cm de altura, medida da base do caule até a extremidade da folha maior) fenótipo muito semelhante entre si. Estas foram transferidas para frascos de cultura de 400 mL contendo 80 mL de meio para cada tratamento (KC, MS, MS $\frac{1}{2}$ e VW), e mantidas nas mesmas condições ambientais citadas anteriormente. Foram utilizados três frascos para cada tratamento, contendo, cada frasco, 15 plântulas. Ao final de mais 180 dias de cultivo, 12 plantas de cada tratamento foram retiradas aleatoriamente e analisadas em relação ao número de folhas e raízes neoformadas, quanto ao comprimento caulinar (considerando a medida da base do caule até a extremidade da folha maior) e o comprimento da maior raiz, além da massa de matéria fresca e seca das porções caulinar e radicular, separadamente. A massa de matéria seca foi mensurada após os caules e raízes terem sido mantidos em estufa a 60 °C, até a obtenção de massa constante.

Os dados sobre a percentagem de sementes germinadas, crescimento e desenvolvimento inicial, bem como cada parâmetro de crescimento analisado, foram submetidos a tratamento estatístico a partir da análise de variância (ANOVA - germinação / MANOVA - desenvolvimento e análises biométricas), seguido do teste de separação das médias utilizando-se o teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da viabilidade de sementes mostrou que 88% (Tab. 2) das sementes eram viáveis, possibilitando elevada percentagem de germinação das sementes.

Vinte dias após os primeiros indícios da germinação de sementes, verificou-se que a maior percentagem de

sementes germinadas foi obtida nos meios MS e MS $\frac{1}{2}$ (88% e 86%, respectivamente) quando comparados aos meios KC e VW (34% e 46%, respectivamente) (Tab. 2). Possivelmente a maior porcentagem de germinação obtida nos meios MS e MS $\frac{1}{2}$, pode estar relacionada a maior concentração de N total (60,06 e 30,03 mmol L⁻¹, respectivamente) em relação aos demais meios; podendo ser considerado também maior teor de K (20,06 e 10,3 mmol L⁻¹, respectivamente) (Tab.1).

Diferindo dos resultados obtidos para *C. warneri*, Suzuki et al. (2009) utilizaram estes mesmos meios de cultura, com exceção do MS $\frac{1}{2}$ para estudar a germinação de *Hadrolaelia tenebrosa* e observaram que o meio de cultura KC propiciou a maior taxa de germinação de sementes (67%). Resultados constrastantes foram observados por Abrão et. al (2014). Trinta dias após a semeadura *in vitro* de *Cattleya loddigesii*, o meio MS (78%) e o meio VW (74%) propiciaram a maior taxa de germinação. Já no meio MS/2 e o meio KC, obtiveram respectivamente 71% e 58% de sementes germinadas.

Semelhante ao demonstrado por Suzuki et al. (2012) o meio MS foi o mais favorável à germinação das sementes de *Hoffmannseggella cinnabarina* (98,3%). Esses resultados permitem afirmar que as respostas germinativas podem variar consideravelmente entre diferentes gêneros e entre as espécies de um mesmo gênero.

Um estudo realizado por Leite & Hebling (2007) com *C. warneri*, utilizando o meio de cultura “Orchid Maintenance Replate Médium” e adicionando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA), demonstrou em todos os tratamentos uma menor percentagem de germinação quando comparados com o presente estudo, sugerindo menor ação de tal fitormônio durante o processo germinativo.

Os resultados de desenvolvimento inicial, decorridos 90 dias após a semeadura *in vitro*, nos diferentes meios de cultura (Fig. 2A) mostraram que a maior parte das sementes nos meios MS e MS $\frac{1}{2}$ encontravam-se no estágio 1 (90,8 e 41,9% respectivamente) acarretando um desenvolvimento mais lento dos protocormos, não sendo observadas plântulas no estágio 4. Com relação às sementes inoculadas no meio VW e KC, estes apresentaram maior percentual de plântulas no estágio 3 (67,9%

Tabela 2. Percentagem de viabilidade e de germinação das sementes de *Cattleya warneri*. Letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos pelo Teste de Tukey (P<0.05). n=1300.

Viabilidade das sementes (%)	
88±7,5	
Meios de cultura	Germinação de sementes (%)
KC	34,1±11,50 b
MS	87,9±10,17 a
MS $\frac{1}{2}$	85,9±15,05 a
VW	46,1±14,17 b

e 75,5%, respectivamente) e não diferiram significativamente entre si; entretanto, no meio KC, já foi possível observar plântulas com presença de pelo menos uma raiz, ou seja, em estágio 4 (5,9%), que denota um desenvolvi-

mento mais rápido das sementes neste meio de cultura.

Os resultados do desenvolvimento inicial dos protocormos decorridos 120 dias da semeadura *in vitro*, são apresentados na figura 2B. Verificou-se que os protocormos no meio MS $\frac{1}{2}$ encontravam-se principalmente no estágio 2 (52,3%) e cerca de 24,3% dos protocormos ainda continuavam no primeiro estágio de desenvolvimento. Nesse período, também os meios KC e VW não diferiram entre si no estágio 3 e apresentaram a maior percentagem de protocormos nesse estágio (65,8% e 75,0%, respectivamente). É possível observar que as sementes inoculadas no meio KC apresentaram plântulas em estágio 4 (26,8%), assim como aos 90 dias de cultivo *in vitro*, permitindo concluir que este meio promove o desenvolvimento inicial mais rápido das plântulas de *C. warneri*, em comparação aos demais meios de cultura utilizados. Possivelmente a alta concentração de nitrogênio total ou na forma de NH_4^+ apresentadas pelo meio MS comparado a KC e VW (Tab. 1), inibiu o crescimento das plântulas, pois a maior parte dos protocormos estava apenas em estágio 1 e por este motivo proporcionou desenvolvimento mais lento em *C. warneri*.

Em *H. tenebrosa* após 120 dias, a maior percentagem de plântulas no estágio 3 mais avançado foi observada no meio VW e as plantas com desenvolvimento mais lento (estádios 1 e 2) encontravam-se no meio KC (Suzuki *et al.* 2009). Stewart & Kane (2006) também verificaram em *Habenaria macroceratitis* que após sete semanas o desenvolvimento inicial foi mais favorável no meio VW, quando comparados aos meios KC e MS. Diferentemente, em *H. cinnabarina*, Suzuki *et al.* (2012) observaram após 120 dias, maior percentagem de protocormos em estágio 3 nos meios MS e KC. É possível observar assim como em *C. warneri*, que a maioria das espécies de orquídeas apresenta aparecimento de raízes posteriormente ao surgimento das folhas. Opostamente ao ocorrido em *C. warneri*, o estudo realizado em *Cattleya bicolor*, Suzuki *et al.* (2010), verificaram que nenhum meio de cultura, dentre os utilizados promoveu de forma acentuada o desenvolvimento desta espécie em 120 dias de cultivo, pois, é possível observar que a maior porcentagem dos protocormos se encontravam em estágio 1 e 2 e a menor em estágio 3 (MS, KC e VW, respectivamente).

Schneider *et al.* (2014), obtiveram aos 120 dias, maior número de protocormos formados em *Cattleya warneri*, quando utilizaram o meio MS $\frac{1}{2}$ com ou sem adição de polpa de banana. Resultado semelhante ao presente estudo que apresentou maior percentagem de protocormos em estágio 1 e 2 no meio MS $\frac{1}{2}$.

Após 180 dias da semeadura *in vitro* (Fig. 2C), foi possível observar que o desenvolvimento inicial das sementes inoculadas no meio MS $\frac{1}{2}$ apresentou maior percentagem de protocormos no primeiro estágio (37,8%) mostrando que este meio acarreta em desenvolvimento mais lento de *C. warneri*. Já no meio MS, verificou-se que os protocormos encontravam-se principalmente em estágio 3 (50,9%), entretanto, não houve a formação de plântulas com raízes (estádio 4). Com relação ao meio

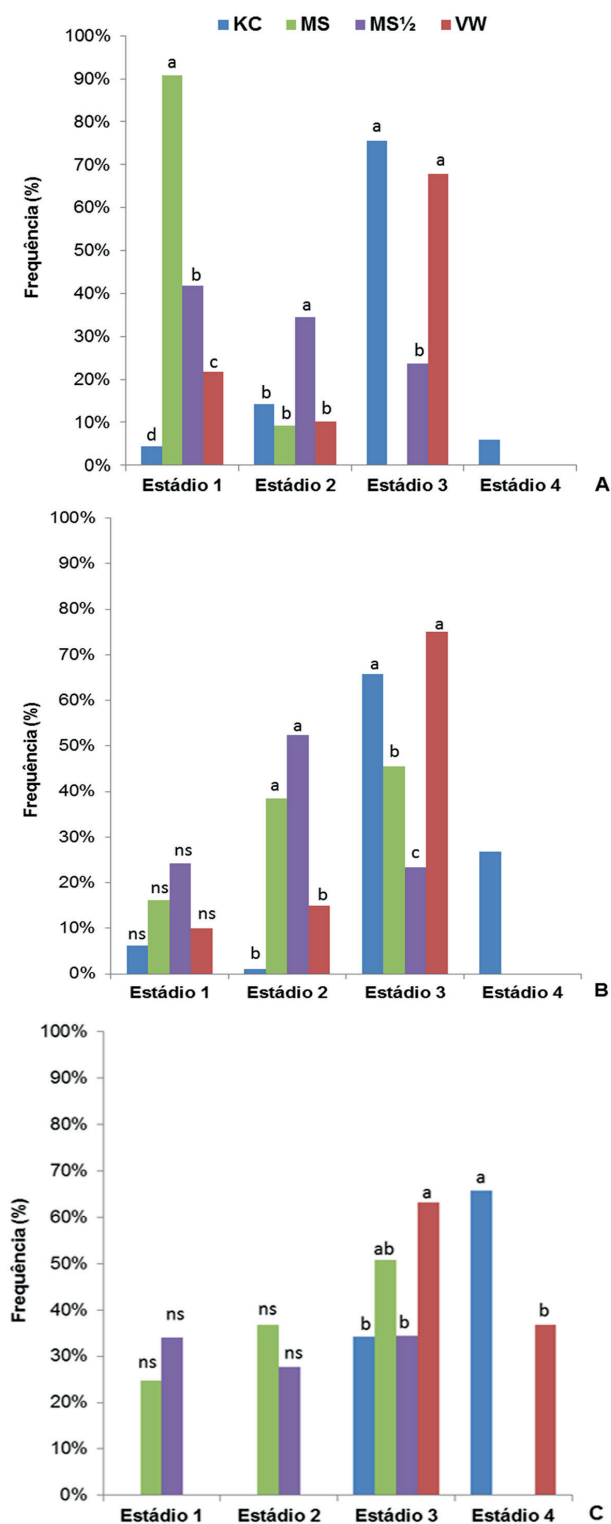


Figura 2. Desenvolvimento inicial de protocormos de *C. warneri* (A) aos 90 dias, (B) aos 120 dias e (C) aos 180 dias. Estádio 1 = protocormo intumescido clorofilado; estágio 2 = protocormo com formação da primeira folha; estágio 3 = protocormo com duas ou mais folhas; e estágio 4 = planta com folhas e raízes. n = 300.

VW, a maior parte dos protocormos encontravam-se em estágio 3 e 4 (63,3% e 36,7%, respectivamente). O meio de cultura KC diferiu significativamente dos demais meios nos estádios 3 e 4 (34,2 e 65,8%, respectivamente). Possivelmente nutrientes em concentrações menores como os do meio KC em comparação dos demais meios (Tab. 1), promoveu o desenvolvimento inicial mais precocemente de *C. warneri*, apresentando plântulas com folhas e raiz tanto aos 90 e 120 dias quanto aos 180 dias, ou seja estágio 4 de desenvolvimento. Apesar do meio VW também apresentar concentrações menores de nutrientes, somente o meio KC resultou na promoção do crescimento. Possivelmente, o balanço de todos os macronutrientes e não somente a menor concentração de determinada substância isoladamente causou essa diferença entre VW e KC.

No estudo realizado com outra espécie epífita presente na Mata Atlântica, *H. tenebrosa*, Suzuki et al. (2009) obtiveram melhor resultado aos 180 dias no meio VW, o qual apresentou maior percentagem de plântulas no estágio 3 e 4.

Diferentemente, em *Cattleya bicolor*, Suzuki et al. (2010) verificaram que no meio KC havia a presença de sementes em todas as fases de desenvolvimento, maior percentagem no estágio 4. Entretanto, o meio que promoveu a maior percentagem de plantas em estágio 4 foi o meio VW. Em *H. cinnabarina*, Suzuki et al. (2012) verificaram que o meio KC foi o mais favorável em relação aos meios MS e VW, após 180 dias de cultivo.

Dutra et al. (2008) observaram que as plântulas de *Bletia purpurea* cultivadas *in vitro* no meio VW, atingiram rápido desenvolvimento da sementeira até o estágio de protocormos com duas folhas. Segundo Dutra et al. (2009) em *Cyrtopodium punctatum*, o estágio mais avançado de plântulas com folhas foi obtido nos meios P723 e MS½. Os meios VW e KC foram inibitórios, no primeiro as plântulas não avançaram além do desenvolvimento de folhas, mas no segundo, sequer houve a formação de plântulas. Por outro lado, em *Habenaria macroceratitis*, Stewart & Kane (2006) verificaram que

o meio MS foi o que mais estimulou o desenvolvimento dos protocormos em relação aos outros meios de cultura após 120 dias de cultivo.

Em *C. loddigesii*, Abrão et al. (2014) também observaram aos 90, 120 e 180 dias, maior desenvolvimento inicial de plântulas em estágio 4 nos meios VW e KC. Em relação aos meios MS e MS/2 os resultados foram semelhantes, observando assim um desenvolvimento mais lento dos protocormos nesses meios por não apresentarem plântulas em estágio 4, apenas em estágio 1 e 2.

Em nosso estudo, observou-se que, os meios MS e MS½ apresentaram-se eficazes para a germinação. É possível que este fato tenha ocorrido devido à alta concentração de nitrogênio total ou na forma de NH_4^+ comparado aos demais meios de cultura, evidenciando que para esta espécie a alta concentração de amônia presente no MS foi mais eficiente para a fase de germinação. No entanto, os meios KC e VW possivelmente por apresentarem redução de sais em comparação ao meio MS, promoveram o melhor desenvolvimento inicial de *C. warneri* já que para esta fase não há exigência nutricional em grandes quantidades para esta espécie. É possível também que elevadas concentrações de nutrientes, apresentadas pelo meio MS inibam o desenvolvimento pós-germinativo de *C. warneri*.

São apresentados a seguir os resultados relativos ao crescimento de plântulas que foram cultivadas *in vitro* durante 180 dias, a partir da transferência de plântulas que já apresentavam 180 dias de idade após a sementeira *in vitro*. O fenótipo das plantas de *C. warneri* cultivadas *in vitro* durante 180 dias em cada meio de cultura está expresso na figura 3.

O comprimento caulinar de *C. warneri* (Fig. 3A) foi significativamente maior em plântulas cultivadas no meio MS (2,6 cm) e o menor foi verificado em plantas cultivadas no meio KC (1,1 cm). Com relação ao comprimento radicular, o meio KC também apresentou o menor desenvolvimento (2,71 cm), com relação aos outros meios: MS/2, MS e VW (respectivamente, 4,11 cm, 3,69 cm e 2,92 cm). Possivelmente o meio MS foi

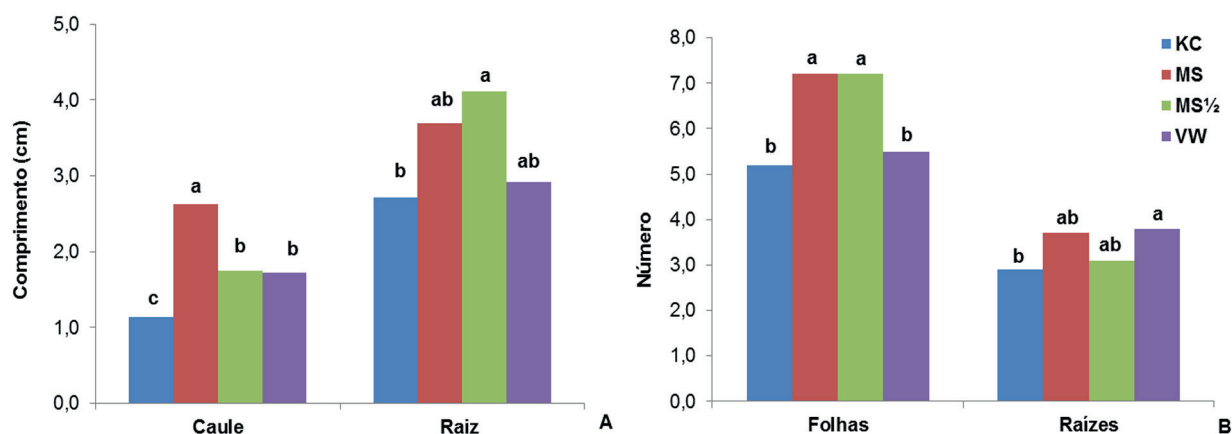


Figura 3. Comprimento médio de caule e da raiz maior (A) e do número de folhas e raízes (B) de *C. warneri* após 180 dias de cultivo *in vitro*. Barras seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). $n = 12$.

benéfico ao desenvolvimento caulinar devido ao alto teor de amônia e nitrato comparada aos demais meios (Tab. 1).

Resultados semelhantes para o comprimento caulinar foram encontrados por Rego-Oliveira & Faria (2005) em *Catasetum fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaensis*, sendo que na primeira espécie o meio MS estimulou o aumento do comprimento caulinar e radicular. Já para a segunda espécie, o maior comprimento caulinar e radicular foi obtido, respectivamente, nos meios MS e KC.

Em *Dendrobium Second Love* não foi possível encontrar diferenças entre os meios MS e VW para o crescimento caulinar (Ferreira 2003), o que difere dos resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que o maior comprimento caulinar em *C. warneri* foi estimulado pelo meio MS. Resultados distintos foram encontrados por Suzuki *et al.* (2010) para *Cattleya bicolor*, que verificaram maior comprimento caulinar em plantas transferidas para o meio VW. O meio KC foi o que promoveu significativamente o alongamento radicular nesta espécie.

Majerowicz *et al.* (2000) observaram em *Catasetum fimbriatum* que dentre as fontes inorgânicas utilizadas no crescimento dessa espécie, o meio contendo relação nitrato/amônio de 2:3, foi o que estimulou o maior crescimento quando comparados aos meios de cultura contendo nitrato ou amônio isoladamente como fonte de N, sendo N na forma amoniacal o nutriente principal para o crescimento desta espécie.

Segundo Grant *et al.* (2001), a deficiência de fósforo pode causar diminuição da respiração e da fotossíntese causando redução da parte aérea, atraso na emergência das folhas, redução no desenvolvimento de raízes secundárias e menor produção de matéria seca. Essa afirmação se opõe aos resultados apresentados de *C. warneri*, pois os meios KC e VW apresentam uma concentração de P mais elevada do que o meio MS (Tab. 1), sendo que as plantas cultivadas em tais meios apresentaram o menor comprimento caulinar e radicular.

A disponibilidade de N e carboidratos nas diferentes partes das plantas parece desempenhar um papel crítico no seu desenvolvimento. A falta de um nutriente afeta a alocação de biomassa através da interferência, em maior ou menor grau, nos processos associados com a fixação de carbono (K, Mg, Mn) ou formação de novos tecidos (N, P, S, Ca), ou ambos (Fe, B, Zn, Cu, Mo). Entretanto, o conteúdo de N na planta pode modificar o padrão de alocação de matéria seca, além de modular o crescimento e limitar a concentração de outro nutriente em diferentes tecidos vegetais (Ericsson 1995). É importante ressaltar que o meio MS comparado aos meios de KC e VW, possui a maior concentração total de N e a maior concentração relativa de nitrato em relação ao amônio.

Para o número médio de folhas de *C. warneri* (Fig. 3B), verificou-se diferença significativa entre os meios de cultura utilizados. Os meios MS e MS½ apresentaram maior número médio de folhas (7,2) em relação aos meios KC e VW (5,2 e 5,5, respectivamente). Com relação às raízes, constatou-se que houve diferença significativa

apenas entre os meios VW (maior número de raízes) e KC (menor número). O meio MS foi o mais eficaz para a produção de folhas em *C. bicolor* (Suzuki *et al.* 2010), no entanto estes autores não utilizaram o meio MS½, diferentemente do presente estudo.

Segundo Blevins (1999), altas concentrações de P prejudicam a adequada absorção de magnésio (Mg) pelas raízes e sua translocação para as folhas. Tal afirmação poderia estar relacionada aos meios KC e VW, ambos apresentaram significativamente o menor número de folhas no presente estudo.

Abrão *et al.* (2014) observaram resultados diferentes do presente estudo, em *C. loddigesii* o maior número de folhas foi estimuladas no meio MS e o maior número de raízes no meio KC.

Araújo *et al.* (2005) observaram em *Cattleya nobilior* que concentrações crescentes de amônio favoreceram ao aumento no número de raízes. Tal informação poderia estar relacionada ao meio VW, pois este apresenta 1,46 mmolL⁻¹, concentração relativamente alta em comparação aos meios KC e MS (0,89 e 0,52 mmolL⁻¹, respectivamente) e apresentou maior número de raízes em *C. warneri*.

Os resultados da produção média de matéria fresca de caule e raízes de plantas de *C. warneri*, cultivadas durante 180 dias *in vitro* (Fig. 4A), mostraram que o meio MS proporcionou significativamente maior produção de matéria fresca caulinar (179,0 mg) em relação aos demais meios utilizados. Já nas raízes, o maior acúmulo de massa de matéria fresca radicular ocorreu também nas plantas cultivadas no meio MS (182,0 mg), significativamente superior aos meios KN e VW. Possivelmente a maior matéria fresca caulinar e radicular no meio MS, foi devido ao potássio em maior concentração comparado aos demais meios (Tab.1), uma vez que esta substância atua no controle osmótico em plantas. Provavelmente as plantas cultivadas nos meios KC e VW, apresentaram menor quantidade de massa de matéria fresca de caule e raiz, por possuir reduzida concentração de K.

Estes resultados encontrados em *C. warneri* foram semelhantes aos obtidos para *C. bicolor* (Suzuki *et al.* 2010) ao verificarem que o meio MS foi significativamente favorável para a produção de matéria fresca caulinar. Para as raízes, maior produção de matéria fresca foi obtida quando estas plantas *C. bicolor* foram cultivadas nos meios MS e MS½, e o meio KC produziu plantas com a menor massa de matéria fresca das raízes. Abrão *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes. As plantas cultivadas no meio MS apresentaram maior acúmulo de massa de matéria fresca caulinar do que nos demais tratamentos. Por outro lado, a maior massa de matéria fresca radicular foi observada no meio MS/2.

Em *H. tenebrosa*, Suzuki *et al.* (2009) verificaram maior massa de matéria fresca nas plantas crescidas nos meios MS e VW; a maior massa de matéria fresca radicular foi verificada no meio VW. Esses resultados diferem do presente estudo.

De acordo com Figueiredo *et al.* (2008), o maior acúmulo de massa de matéria fresca caulinar nas plantas

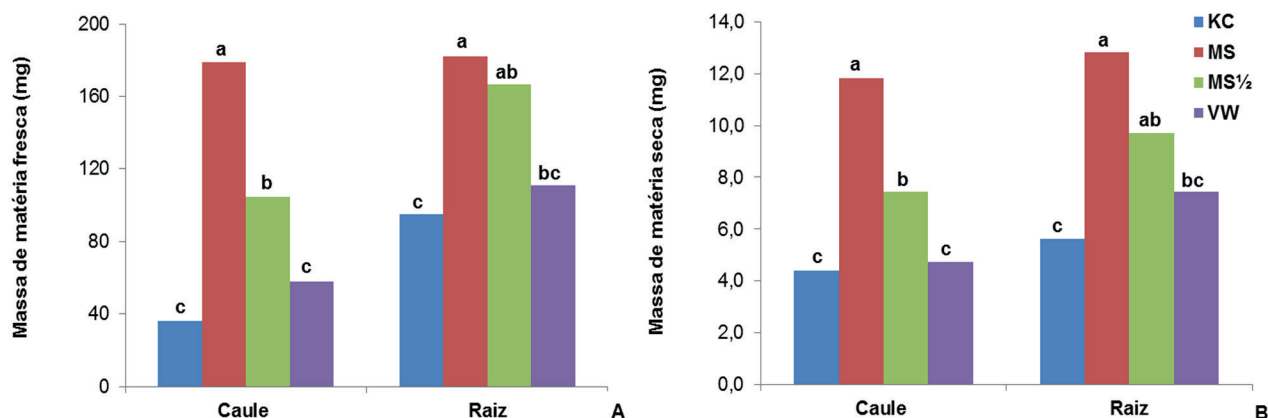


Figura 4. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre a produção matéria fresca (A) e seca (B) de caules e raízes de *C. warneri*, após 180 dias de cultivo *in vitro*. Barras seguidas de letras diferentes apresentam variação significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). $n = 12$.

cultivadas no meio MS, pode estar relacionado a concentração de K deste meio, pois tal nutriente possui entre as funções, a regulação osmótica e o controle hídrico.

Com relação à produção de matéria seca de caule e raízes das plantas de *C. warneri* (Fig. 4B), foi possível observar que o meio MS proporcionou significativamente maior massa de matéria seca caulinar (11,8 mg). Para a matéria seca radicular, o meio MS também foi o que apresentou estatisticamente maior produção (12,8 mg).

Em estudos com *H. tenebrosa*, Suzuki et al. (2009) observaram maior produção de matéria seca caulinar também no meio MS. Já para as raízes, o meio VW favoreceu significativamente a produção de matéria seca, diferentemente do que foi verificado neste estudo para *C. warneri*. Suzuki et al. (2010) verificaram em *C. bicolor* produção de matéria seca significativamente maior nos caules das plantas cultivadas nos meios MS e VW; e para as raízes, o maior acúmulo de massa de matéria seca foi observado em plantas no meio MS.

Diferentes resultados foram encontrados para plantas de *Cyrtopodium paranaensis* e *Catasetum fimbriatum* (Rego-Oliveira & Faria 2005). Em *C. paranaensis*, o meio MS foi o mais favorável para a produção de matéria seca caulinar. Entretanto, em *C. fimbriatum*, o melhor resultado foi observado no meio KC. Para a massa de matéria seca radicular das espécies *C. paranaensis* e *C. fimbriatum*, esses autores verificaram que o meio VW foi positivo para a primeira espécie e o MS para a segunda.

Abrão et al. (2014) observaram em *C. loddigesii*, maior acúmulo significativo de massa de matéria seca dos caules nos meios MS e MS/2. No entanto, verificaram que não houve efeito significativo dos meios de cultivo no acúmulo de massa de matéria seca nas raízes. Esses resultados diferem do presente estudo.

Todos os resultados obtidos evidenciam que o meio de cultura é extremamente importante para o sucesso na germinação das sementes, para o desenvolvimento inicial e o crescimento subsequente das plantas de *C. warneri*. Assim como foi verificado para outras orquídeas (Dutra et al. 2008, Suzuki et al. 2009, Suzuki et al. 2010, Suzuki

et al. 2012), o meio favorável à germinação pode não ser benéfico para as fases posteriores do desenvolvimento de *C. warneri*, apontando a necessidade de se estudar qual meio de cultura é o mais favorável para cada espécie de orquídea, principalmente aquelas ameaçadas de extinção, uma vez que a germinação e o desenvolvimento das plantas variam de uma espécie para outra; e também verificar para cada espécie os meios que favorecem cada etapa do desenvolvimento das orquídeas, que estimulam o crescimento e favorecem a conservação destas espécies ameaçadas.

Em resumo, foi possível concluir para *C. warneri* que a germinação ocorre favoravelmente nos meios MS e MS½ proporcionando maior percentagem de germinação. Já na fase de desenvolvimento inicial dos protocormos, somente o meio KC apresentou plântulas no estágio mais avançado. Em relação aos parâmetros biométricos analisados, MS e MS½ foram os meios que proporcionaram maior crescimento das plântulas. Cada etapa do desenvolvimento *in vitro* desta espécie exige um meio de cultura, confirmando a existência de uma necessidade nutricional específica para cada etapa do desenvolvimento das orquídeas.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M.C.R., JORGE, J., PESCADOR, R. FERREIRA, W.M. & SUZUKI, R.M. 2014. Germinação de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae) *Revista Brasileira de Biociência*, 12: 141-17.
- ARAÚJO, A. G., PASQUAL, M., RODRIGUES, V. A., SILVA, A. B. & SOARES, G. A. 2005. Concentração de KNO₃ e NH₄NO₃ no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Plant Cell Culture and Micro-propagation*, 1: 31-36.
- BRAEM, G.J. 1986. *Cattleya* – Band II: Die unifoliaten (einblättrigen) Cattleyen. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow. 94 p.
- BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V. T., BARBERENA, F. F. V. A., FRAGA, C. N., PESSOA, E. M., FORSTER, W., MENINI NETO, L., FURTADO, S. G., NARDY, C., AZEVEDO, C. O. & GUIMARÃES, L. R. S. 2014. *Orchidaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>.

- BLEVINS, D.G. 1999. Por que as plantas precisam de fósforo? Potafos - Informações agronômicas, 87: 4-5.
- DRESSLER, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland, Dioscorides Press, 314 p.
- DUNSTERVILLE, G.C.K. & GARAY, L.A. 1976. *Venezuelan orchids illustrated*. London: Andre Deutsch. 463 p.
- DUTRA, D., JOHNSON, T.R., KAUTH, P.J., STEWART, S.L., KANE, M.E. & RICHARDSON, L. 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 94: 11-21.
- DUTRA, D., KANE, M.E. & RICHARDSON, L. 2009. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: A propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96: 235-243.
- ERICSSON, T. 1995. Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil*, 168-169: 205-214.
- FERREIRA, W.M. 2003. *Comportamento organogenético de meristemas caulinares de Dendrobium Second Love (Orchidaceae) in vitro*. 142 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- FERREIRA, W.M. & SUZUKI, R.M. 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Loiola, M.I.B., Baseia, I.G. & Lichston, J.E. (Eds.). *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. Imagem Gráfica, Natal. p. 67-68.
- FIGUEIREDO, M. A., PASQUAL, M., ARAUJO, A. G., JUNQUEIRA, K. P., SANTOS, F. C. & RODRIGUES, V. A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciência Rural*, 38: 255-257.
- GRANT, C.A., FLATEN, D.N., TOMASIEWICZ, D.J. & SHEPPARD, S.C. 2001. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Potafos – Informações agronômicas*, 95 1-5.
- KNUDSON, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73: 1-25.
- KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- LAKON, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of seeds. *Plant Physiology*, 24: 389-394.
- LEITE, V.C.A. & HEBLING, S.A. 2007. Efeito do ácido giberélico (GA₃) e da luz na germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya warnerii* T. Moore. *Natureza on line*, 5: 55-62. Disponível em: < <http://www.naturezaonline.com.br/> >
- MAJEROWICZ, N., KERBAUY, G.B., NIEVOLA, C.C. & SUZUKI, R.M. 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*, 44: 195-206.
- MMA-MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2008. Instrução Normativa nº6, de 23 de setembro de 2008. *Diário Oficial da União*, 185: 75-83.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- REGO-OLIVEIRA, L. & FARIA, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulation. *Acta Scientiarum*, 1: 1-5.
- SCHNEIDER, L. ARAÚJO, J.S.P. & ZAFFARI, G.R. 2014. Seed Germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in alternative culture media. *American International Journal of Contemporary Research*, 4: 60-66.
- STEWART, S.L. & KANE, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae) a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86: 147-158.
- SUZUKI, R.M., MOREIRA, V.C., NAKABASHI, M. & FERREIRA, W.M. 2009. Estudo da germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. *Hoehnea*, 36: 657-666.
- SUZUKI, R.M., ALMEIDA, V., PESCADOR, R. & FERREIRA, W.M. 2010. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). *Hoehnea*, 37: 719-730.
- SUZUKI, R.M., MOREIRA, V.C., PESCADOR, R. & FERREIRA, W.M. 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 48: 500-511.
- VACIN, E.F. & WENT, F.W. 1949. Some pH in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110: 605-617.
- WHITNER, C.L. 1988. The Cattleyas and their relatives, v. 1: The Cattleyas. Portland: Timber Press. 147 p.